植 物 分 类 学 报　44 (6): 627–640(2006)　　doi:10.1360/aps06059
Acta Phytotaxonomica Sinica　　http://www.plantsystematics.com

粗茎秦艽与西藏秦艽(龙胆科)种间的形态学、染色体与分子界定

[1]张小兰　[1]葛学军　[2]刘建全*　[3]袁永明

[1](中国科学院华南植物园　广州 510650)

[2](中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物进化与适应实验室　西宁 810001)

[3](北京师范大学生命科学学院　北京 100875)

Morphological, karyological and molecular delimitation of two gentians: *Gentiana crassicaulis* versus *G. tibetica* (Gentianaceae)

[1]ZHANG Xiao-Lan　[1]GE Xue-Jun　[2]LIU Jian-Quan*　[3]YUAN Yong-Ming

[1](*South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 510650, China)

[2](*Laboratory of Biological Evolution and Adaptation*, *Northwest Plateau Institute of Biology*, *the Chinese Academy of Sciences*, Xining 810001, China)

[3](*College of Life Sciences*, *Beijing Normal University*, Beijing 100875, China)

Abstract *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. and *G. tibetica* King ex Hook. f. are confusing gentians. The former has smaller corolla and blue-purple limbs whereas the latter has larger corolla and purple-brown limbs. Intermediate types are often found in southeast Xizang where both species are putatively considered to occur. A question has been raised whether these intermediate types were produced by introgression between the two species, which further contribute to the taxonomic ambiguity. In the present study, we comprehensively compared morphological variations, chromosome numbers, and sequences of two DNA fragments from populations of the intermediate types and those of the two typical species. We sequenced cpDNA *trn*S-G and nuclear ITS fragments of 69 individuals of 10 populations, counted chromosome number of 26 individuals of six populations and measured morphological variation of 54 specimens. We found that corolla size is highly correlated with ploidy level. The populations of typical *G. crassicaulis* from Yunnan were diploid (2*n*=26) with small corolla while those of *G. tibetica* from western Xizang were tetraploid (2*n*=52) with large corolla. The populations of the intermediate types from southeast Xizang were tetraploid with large corolla, and a few individuals with purple to brown limbs. These features suggest that the intermediate types show more similarities to *G. tibetica*. However, DNA sequence evidence unambiguously grouped those populations with *G. crassicaulis*. Both nuclear and chloroplast DNA showed consistent results: the intermediate populations showed identical cpDNA and very similar ITS sequences to typical *G. crassicaulis*. No sequence variation beyond what occurred in typical *G. crassicaulis* and *G. tibetica* was found from multiple individuals of the intermediate types. Thus the hypothesis of a recent introgression or hybridization between the two species could be rejected. Our results demonstrated that

---

2006-03-29 收稿, 2006-08-05 收修改稿。

基金项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX-SW2-106); 全国优秀博士论文专项基金; 国家自然科学基金项目(30572329)(Supported by Key Innovation Plan, Grant No. KSCX-SW2-106, Special Fund of Outstanding Ph.D Dissertation from the Chinese Academy of Sciences and the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30572329)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ljqdxy@public.xn.qh.cn)。

polyploidization had contributed to the intraspecific variation in *G. crassicaulis* and that the tetraploid individuals of this species showed morphological convergence with tetraploid *G. tibetica*, which blurred the morphological delimitations of the two species in southeast Xizang. Nevertheless, molecular markers can discriminate convergence and correctly attribute the intermediate populations or individuals to the correct species circumscription. Our results provided a case study to circumscribe the closely related species based on a comprehensive combination of morphological, karyological and molecular evidence. In addition, the geographical distributions of diploids and tetraploids within *G. crassicaulis* and the implications for the origin and dispersals of this alpine species were also discussed.

Key words *Gentiana crassicaulis*, *Gentiana tibetica*, polyploidization, morphological convergence, species delimitation.

摘要 粗茎秦艽*Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk和西藏秦艽*G. tibetica* King ex Hook. f.的主要区别是前者花冠小、檐部蓝色, 后者花大、檐部紫褐色; 但二者在西藏东南部地区的形态界限不清楚, 具有较多的中间形态过渡类型。本文以该地区居群作为主要研究对象, 并以云南和西藏其他地区的典型形态类群为对照, 比较研究了两个物种间的形态学、染色体和分子标记界定。共研究了10个居群69个个体的*trn*S-G和ITS序列、6个居群26株植株的染色体倍性和54份标本的形态变异。结果表明, 花冠大小与染色体倍性密切相关。云南等地分布的粗茎秦艽均为二倍体(2*n*=26), 花冠较小; 西藏西部的西藏秦艽均为四倍体(2*n*=52), 花冠较大。而西藏东南部的形态过渡类型也为四倍体, 花冠较大, 且其中的部分植株花颜色变浅, 类似西藏秦艽。但母系与双亲遗传背景的分子标记都表明西藏东南部居群与典型形态特征上的粗茎秦艽聚为一支, 应属于粗茎秦艽; ITS序列上也未发现杂合位点。这些分子证据都不支持近期杂交渗入造成形态过渡性的假设。综合分析表明多倍化造成了粗茎秦艽种内形态特征的变异, 其四倍体个体与四倍体西藏秦艽在形态特征上的趋同, 最终导致了二者在西藏东南部地区形态界限的模糊。但是, 分子证据可以很好地区分这种多倍化造成的形态趋同。我们的研究结果还表明, 综合利用分子、染色体和广义形态证据来解决近缘种之间种范围的界定具有更大的优势。此外, 还讨论了粗茎秦艽不同染色体倍性的分布以及该高山物种可能的起源与扩散途径。

关键词 粗茎秦艽; 西藏秦艽; 多倍化; 形态趋同; 种的界定

龙胆属*Gentiana* L.是龙胆科Gentianaceae最大的一个属, 广泛分布于欧洲、亚洲和北美的温带高山地区, 中国西南部是该属物种多样性和特有种分布最为丰富的地区(Ho & Liu, 2001)。近年来, 有关龙胆属的研究已有较多的文献报道, 主要集中在形态、核型分析、系统发育和生物地理学等方面(何廷龙, 1985, 1988; Yuan, 1993; Yuan & Küpfer, 1997; Yuan et al., 1996, 1998; Ho et al., 1996); 但组内种之间的形态与遗传分化研究较少; 一些近缘种类的分类鉴定困难仍然没有得到很好的解决。龙胆属秦艽组sect. *Cruciata* Gaudin内的粗茎秦艽*G. crassicaulis* Duthie ex Burk.和西藏秦艽*G. tibetica* King ex Hook. f.之间种范围的形态界定就是一个突出的例子。

粗茎秦艽和西藏秦艽是秦艽组内的两个形态近缘种, 它们与秦艽组内其他物种的区别表现在茎生叶并不比莲座叶小, 最上部叶大, 卵状披针形, 呈苞片叶状, 包被紧密的头状聚伞花序。粗茎秦艽和西藏秦艽之间的主要鉴别特征是前者花冠壶状, 檐部深蓝色或蓝紫色, 内面有斑点, 较小, 长2–2.2 cm; 而后者的花冠宽筒形, 内面黄绿色, 冠檐外面带紫褐色, 较大, 长(2.6)3.0–3.2 cm(何廷农, 1988; Ho & Liu, 2001)。此外, 据野外调查发现, 这两个种的花冠在不同的生长时期颜色有所变化, 对于处于开花晚期或果期的粗茎秦艽和西藏秦艽来说, 花冠的颜色区别很小, 花冠下部均黄色, 冠檐均变为淡黄色至紫

褐色。标本室的标本很多都采自花果期, 用于鉴别的花冠颜色已经褪变或没有颜色记录, 给二者的鉴定带来困难。粗茎秦艽的模式标本采自云南丽江, 西藏秦艽的模式标本采自西藏亚东(Ho & Liu, 2001)。马毓泉等(1964)和夏光成等(1965)过分强调花颜色在区分两个种中的作用, 认为粗茎秦艽和西藏秦艽在四川、云南和西藏均有分布, 二者在一些地区呈同域分布, 他们把没有新鲜花颜色记录、标本为褐色花的云南丽江(毕玉庆2073, HNWP)和四川标本(乾宁, 姜恕2261, HNWP)也归入在西藏秦艽中。Ho和Liu(2001)重视了花冠大小与花颜色的相关性分析以及地理隔离分布概念, 对于没有颜色记录的标本主要依据花冠大小来区分两个种。他们在龙胆属分类修订专著中进一步认为粗茎秦艽主要分布在云南西北部、四川西部; 而西藏秦艽则主产西藏的中西部及临近的国外地区; 但对这两个物种在西藏东南部标本的确认仍然遵循以前的处理(马毓泉等, 1964; 夏光成等, 1965; 何廷农, 1988), 认为这两个物种在该地区重叠分布。

2002年8–10月和2003年的9–10月, 我们对粗茎秦艽和西藏秦艽在西藏和四川地区的分布居群进行了详细的野外调查, 发现从西藏芒康往西至西藏东南部的大部分地区, 存在若干形态上介于粗茎秦艽和西藏秦艽之间的居群和个体: 一些居群具有典型的粗茎秦艽分类特征, 花小和冠檐蓝色; 但另一些居群或者部分居群的一些个体, 其花冠长度明显大于采自云南的粗茎秦艽, 且部分植株花期时花冠也为淡黄色(如波密的居群, 刘建全1214B), 这两项特征共同表明这些个体应属于西藏秦艽。实际上, 野外观察的结果与标本室长期存在的鉴定结果是基本相吻合的: 采自西藏东南部的部分标本鉴定为西藏秦艽, 如然乌的标本(夏光成等308, HNWP)和波密的标本(夏光成等580, HNWP), 而该地区的另外一部分标本则鉴定为粗茎秦艽(马毓泉等, 1964; 夏光成等, 1965; Ho & Liu, 2001)。我们最近的研究发现, 秦艽组存在快速成种的现象, 种之间的分化较小、生殖隔离可能不彻底(Zhang et al., unpublished data); 因而这一地区可能确实两个物种都有分布, 过渡形态的标本则可能是两个物种相互之间杂交渗入造成的。我们最初的假设是西藏东南部花大且为黄色的居群或者个体是西藏秦艽, 花小且为蓝色的居群或者个体是粗茎秦艽, 花大但颜色为蓝色的个体或者居群是二者杂交渗入的后代。这一假设也与地理分布相吻合, 靠云南、四川的居群为粗茎秦艽, 近于林芝的居群是西藏秦艽, 但有较多的粗茎秦艽渗入成分。但是, 已有的研究报道粗茎秦艽为二倍体($2n=2x=26$), 西藏秦艽为四倍体($2n=4x=52$)(Yuan et al., 1998); 这种不同倍性之间的杂交应该产生三倍体, 即形态上介于二者之间的植株为不育的三倍体植株。但野外观察发现这些植株都能正常结实。由于研究的居群和个体较少, 这两个物种种内是否存在二倍体–多倍化的分化仍然不清楚, 因此, 西藏东南部既可能是西藏秦艽的二倍体分布地也可能是粗茎秦艽四倍体的分布地。杂交、多倍化或者二者之间的相互作用都可能带来物种种内的形态变异, 并导致与近缘相关物种的形态界限不清楚和种范围界定方面的困难(Grant, 1963)。

近年来, 利用分子手段解决种内或者种间的形态变异和种范围的界定, 特别是杂交渗入方面取得了重要进展(Arnold, 1997; Rieseberg, 1997), 从而也为经典分类和分子系统学或者遗传分化建立了一个结合点。比较植物叶绿体和核基因的组成、分化和基因树, 能很好区分同源多倍化、杂交–异源多倍化以及同倍性水平上的渗入杂交造成的形态变异(Koch et al., 2003)。此外, 分子证据能较好地鉴别形态上的隐性种(cryptic species)(Dick et al., 2003; Dawson et al., 2005)。ITS和部分叶绿体基因或者DNA片段由于引物通用、容易扩增和测序，广泛应用于研究植物的种内变异以及种间关系(如Sakai et al., 2003；王玉金等, 2004；陈生云等, 2005; Wang et al., 2005；张茜等, 2005; Liu et al., 2006)。龙胆属由于已经有深入的分类学专著修订，每个种形态特征在地理上的分布变异趋势十分清楚(Ho & Liu，2001)，从而为我国研究物种的分化，特别是为选择形态过渡地区的材料来研究形态变异的机制和原因提供了较好的模式系统。在本研究中，我们采集了10个居群，分别代表典型的粗茎秦艽、西藏秦艽以及形态上介于二者之间过渡地区的材料，采用形态特征统计、染色体倍性分析和对母系遗传的叶绿体基因和双亲遗传的ITS片段进行测序等方法进行综合研究，目的在于：(1)对西藏东南部形态变异较大居群的染色体倍性进行研究，这些居群在染色体组成上是二倍体还是四倍体？对已有标本的花冠长度和花序总苞片长度进行测量，以确定这两个形态学指标是否与染色体倍性相关。(2)比较它们在ITS和*trn*S-G序列基因树之间的一致性，刻画两物种的遗传背景和亲缘关系，明确形态上不同于典型粗茎秦艽和西藏秦艽的这些居群在遗传组成上是属于粗茎秦艽还是西藏秦艽或是这两个种的杂交居群。这两个物种之间的形态和分子界定有何联系与区别？进而综合分析什么原因导致了这些居群的形态过渡性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

用于本实验的分析材料共10个居群69个个体，分别采自云南、四川和西藏。植物叶片用硅胶干燥后提取总DNA。共收集了26份来自6个居群的形态上有变异的个体的种子。根据野外观察的情况，西藏芒康至波密的居群与典型粗茎秦艽和西藏秦艽在形态上有较明显的差别，所以对这几个居群我们分析了相对较多的个体。用于序列分析的材料及相关信息见表1和图1，用于染色体计数的材料见表2。凭证标本分存于中国科学院华南植物园标本馆(IBSC)和中国科学院西北高原生物研究所标本馆(HNWP)。系统树构建以欧洲秦艽*G. cruciata* L.为外类群。

1.2 实验方法

1.2.1 染色体计数观察和花序总苞片长度及花冠大小的测量　在野外对单个植株的种子分别取样。参照Yuan(1993)的方法，种子用500×10^{-6} g·mL^{-1}的赤霉素处理后萌发，室温下取根尖用饱和α-溴(代)萘水溶液预处理110 min，然后用Carnoy固定液(95%乙醇:冰醋酸＝3:1)固定4 h以上，根尖用蒸馏水洗涤后在1 mol/L HCl溶液中于65 ℃恒温解离2–3 min，1%卡宝品红染色，压片观察计数。每个根尖至少统计5个细胞的染色体数目，每棵植株统计10个以上种子的根尖，共研究了26份植株的染色体倍性。

对中国科学院西北高原生物研究所标本馆(HNWP)和中国科学院华南植物园标本馆(IBSC)采自云南、四川和西藏的28份标本以及用于染色体分析的26份植株(2003年采集)的花序总苞片长度及花冠长度用直尺进行了直接测量并分别作图(每个头状聚伞花序量取3朵花以上，取其平均值，以花序总苞长度为纵坐标、花冠长度为横坐标做形象散点图)，单位为cm。用one–way ANOVA分析检验倍性与花冠长度之间的相关性。

表1　材料来源、凭证标本及分子标记分析的个体数目

Table 1　The origin of the materials, voucher information and the number of individuals used for DNA sequencing

居群号 Population code	采集地 Locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	凭证标本$^{1)}$ Voucher$^{1)}$	样本数$^{2)}$ Sample size$^{2)}$
LT	四川理塘 Litang, Sichuan	30°09′ E	99°14′ N	3800	袁永明, 葛学军(Y. M. Yuan & X. J. Ge) CN2K2-92 (IBSC)	5
LJ	云南丽江 Lijiang, Yunnan	26°53′ E	100°15′ N	3200	刘建全(J. Q. Liu) 2286 (HNWP)	5
RM	西藏芒康如美 Rumei, Markam, Xizang	29°39′ E	98°27′ N	3700	袁永明, 葛学军(Y. M. Yuan & X. J. Ge) CN2K2-126 (IBSC)	10
BD	西藏芒康邦达 Bamda, Markam, Xizang	29°19′ E	98°41′ N	3400	袁永明, 葛学军(Y. M. Yuan & X. J. Ge) 2002-001 (IBSC)	10
MK	西藏芒康 Markam, Xizang	29°42′ E	98°36′ N	3800	袁永明, 葛学军(Y. M. Yuan & X. J. Ge) 2002-002 (IBSC)	10
ZG	西藏左贡 Zogang, Xizang	29°55′ E	97°39′ N	3820	袁永明, 葛学军(Y. M. Yuan & X. J. Ge) CN2K2-122 (IBSC)	10
BM	西藏波密 Bomi, Xizang	29°57′ E	94°54′ N	3075	刘建全(J. Q. Liu) 1214 B (HNWP)	4
NG	西藏浪卡子 Nagarzê, Xizang	29°03′ E	90°24′ N	3700	刘建全(J. Q. Liu) 1117 (HNWP)	5
QX	西藏曲水 Qüxü, Xizang	29°18′ E	90°21′ N	3650	刘建全(J. Q. Liu) 1110 (HNWP)	5
QS	西藏曲松 Qusum, Xizang	29°02′ E	92°18′ N	3980	刘建全(J. Q. Liu) 1156 (HNWP)	5

1)凭证标本分存于中国科学院华南植物园标本馆(IBSC)和中国科学院西北高原生物研究所标本馆(HNWP); 2)表格中所指的样品数是指在该研究中每个居群分子标记分析的个体数。

1) Voucher specimens were kept in South China Botanical Garden herbarium (IBSC) and Northwest Plateau Institute of Biology (HNWP), the Chinese Academy of Sciences. 2) The numbers denote the individuals being sequenced in each population.

1.2.2　DNA提取, 扩增, 纯化、测序及序列边界的确定　叶片总DNA提取采用改进的CTAB法(Doyle & Doyle, 1987)。对每个居群采集的所有个体(表1)进行测序。ITS区扩增使用引物“1”和“4”(White et al., 1990), *trn*S-G片段扩增使用引物“*trn*s”和“*trn*g”(Hamilton, 1999)。PCR总反应体积为25 μL: 双蒸水17.9 μL, 50 mmol/L的$MgCl_2$ 0.5 μL, 10×Tris-HCl反应缓冲液2.5 μL(100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L $MgCl_2$, 1% Triton X-100), 10 mmol/L dNTP 0.3 μL, 5 pmol/μL的引物各1.25 μL, *Taq*酶0.3 μL(5 units/μL)。扩增程序为: 94 ℃ 3 min, 接以35个循环的94 ℃ 45 s、58 ℃ 50 s、72 ℃ 1 min, 最后以72 ℃ 7 min终止反应。扩增产物用CASpure PCR纯化试剂盒(上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司)纯化。纯化产物利用和扩增时同样的引物和Amersham公司的DYEnamic Dye Terminator Cycle Sequencing Kit试剂盒根据推荐的程序进行测序PCR扩增, 产物经纯化后在Megabase 500自动测序仪上进行单链DNA测序。ITS序列范围根据GenBank上龙胆属植物*G. frigida* Haenke的ITS全序列(Yuan et al., 1996)确定。*trn*S-G的序列边界参考*Glycine dolichocarpa* Tateishi & Ohashi的相应序列而定(Sakai et al., 2003)。所有用于分析的序列都是此次研究新测的结果, 已注册到GenBank (表3)。

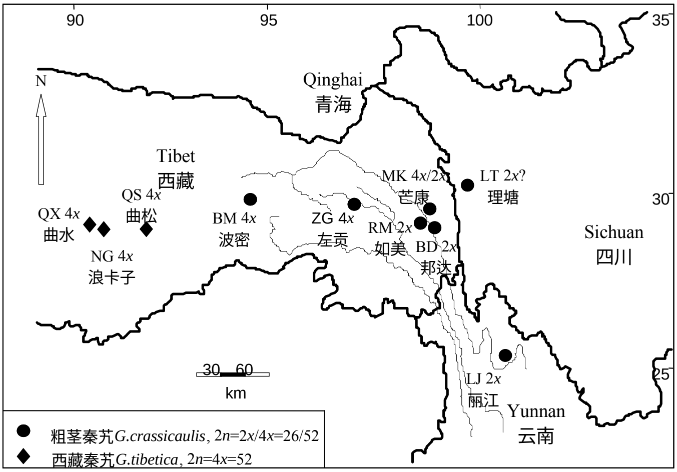

图1 粗茎秦艽和西藏秦艽研究居群的地理分布图及染色体倍性 居群代号所对应的采样地与表1一致。

Fig. 1. The geographical distribution of the populations studied in *Gentiana crassicaulis* and *G. tibetica* and their corresponding chromosomal ploidy. Population codes referred to Table 1.

表2 染色体计数居群、植株数目及染色体数目

Table 2 The populations studied, individual numbers and their chromosome numbers

居群号[1)] Population[1)]	植株数目 The number of analyzed individuals	染色体数目 Chromosome number
LJ	1	$2n = 26$ (Yuan et al., 1998)
RM	10	$2n = 26$
BD	9	$2n = 26$
MK	1	$2n = 52$
ZG	2	$2n = 52$
BM	2	$2n = 52$
LK	2	$2n = 52$

1)居群代号所对应的采样地与表1一致。

1) Population codes referred to Table 1.

表3 粗茎秦艽与西藏秦艽ITS和*trn*S-G的序列信息

Table 3 The information of ITS and *trn*S-G sequences of *G. crassicaulis* and *G. tibetica*

基因片段DNA fragment	种 Species	序列号 GenBank accessions	片段长度 Length (bp)	碱基替代 Substitution	插入/缺失 Indels (bp)	遗传距离 Genetic distance P^a (%)
nrDNA: ITS	*G. crassicaulis*	DQ398636	626	9	1 (3)	1.0
	G. tibetica	DQ398640	629			
cpDNA: *trn*S-G	*G. crassicaulis*	DQ398743	528	3	4 (36)	0. 6
	G. tibetica	DQ398747	567			

P^a (%): P 模式遗传距离，每个缺失或插入当作一个位点。

P^a (%): Uncorrected *p*–distance, an indel was regarded as a nucleotide substitution.

1.3 序列对齐与数据分析

所得序列用CLUSTAL X软件(Thompson et al., 1997) 进行对齐排列，并进行适当手工检查与校正，空位(gap)始终作为缺失(missing)数据。每个居群内部序列相同的个体只选取一个组成数据矩阵，用PAUP4.0b10(Swofford, 2000)进行分析。利用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)对ITS序列矩阵和叶绿体*trn*S-G序列矩阵进行独立分析。程序选择及参数为:

MP采用启发式搜索, TBR支长交换, MULTARS, ACCTRAN优化, 100次随机序列加入。用自展百分率表示分支支持率(bootstrap, 重复1000次)。NJ分析所采用的距离矩阵按非校正的“ P ”模式计算。用MEGA3.0(Kumar et al., 2004)对每个片段两个物种之间的遗传距离进行了计算, 并列出种之间的变异信息位点。

2　结果

2.1　染色体计数

对来自6个居群的26株植株的种子进行了染色体压片计数, 其中19个个体为二倍体($2n=2x=26$), 7个为四倍体($2n=4x=52$), 结果如表2所示。典型分布地的粗茎秦艽和西藏秦艽的染色体数目分别为26和52。西藏东南地区的3个居群, 如芒康如美(RM)、邦达(BD)和芒康(MK), 共计20份种子, 其中RM和BD的19份均为二倍体, 它们在形态上与典型的粗茎秦艽很相似, 其花冠冠檐深蓝色。而形态上介于粗茎秦艽和西藏秦艽之间的几个居群包括MK、ZG和BM的5个个体均为四倍体($2n=52$), 这些居群的冠檐颜色主要是深蓝色, 部分植株为淡黄色。

2.2　形态学数据测量

对用于染色体分析的26个个体的花冠长度和总苞片长度进行了测量, 结果如图2所示。二倍体粗茎秦艽花冠长度均在2.0–2.5 cm范围内, 而采自波密(BM)、左贡(ZG)和芒康(MK)的5个四倍体个体花冠明显大于二倍体, 在3.8–4.5 cm之间, 染色体倍数和花冠长度存在一定的正相关($p< 0.005$)。二倍体粗茎秦艽总苞片长度变异幅度较大, 在8.0–19.5 cm范围内, 四倍体植株总苞长度均落在二倍体长度范围之内, 染色体倍性与花序总苞长度没有明显的相关关系。由图3可知, 采自云南(YN)、四川(SC)及两省与西藏接壤的芒康(MK)(部分标本)、以及芒康如美(RM)等地标本的花冠长度明显小于采自西藏波密(BM)、左贡(ZG)、昌都(CD)、察隅(ZY)等地标本的花冠长度。四川(SC)以及芒康(MK)的小花冠个体没有相应的种子做染色体分析, 因为花冠大小与染色体倍性呈正相关, 可以推测这些个体应该是二倍体。综合花冠大小推测的染色体倍性以及进行了染色体分析的个体, 将研究居群染色体倍性的分布总结如图1。此外, 这些区域标本的总苞长度变异幅度很大, 与地域分布没有相关性。标本馆

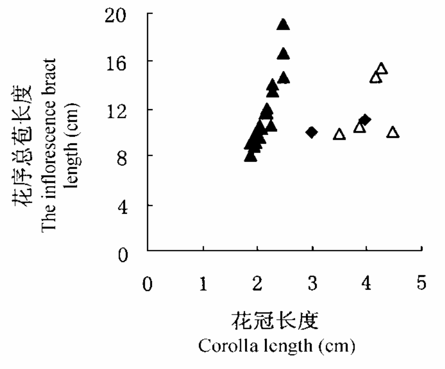

图2　用于染色体分析的植株花冠长度和总苞长度的散点图　实心三角形为典型的粗茎秦艽或者西藏东南部居群染色体为$2n=26$的个体, 实心菱形为典型的西藏秦艽$2n=52$, 空心三角形为过渡居群$2n=52$的个体。

Fig. 2. The scatter plots of corolla length against the inflorescence bract of individuals with chromosome counted. Solid triangles, typical *G. crassicaulis* and those collected from southeast Tibet with $2n=26$; solid rhombi, typical *G. tibetica*; and blank triangles, those intermediate individuals collected from southeast Tibet with $2n=52$.

内花冠檐部颜色记载为深蓝色或蓝紫色的标本都鉴定为粗茎秦艽；而淡黄色或黄绿色或者野外没有颜色记载的标本则鉴定为西藏秦艽或者粗茎秦艽。根据图3的分析结果可以得知早期的分类学家对这类标本的处理主要根据花冠的长度，认为西藏秦艽的花冠明显大于粗茎秦艽的花冠，把花冠长度在2.6–3.5 cm范围之内的标本鉴定为西藏秦艽；花冠长度短的则鉴定为粗茎秦艽，西藏东南部的标本归在两个种下。野外考察的结果发现，西藏东南部部分居群(如西藏波密居群)中花冠大的部分个体花的颜色是淡黄色。

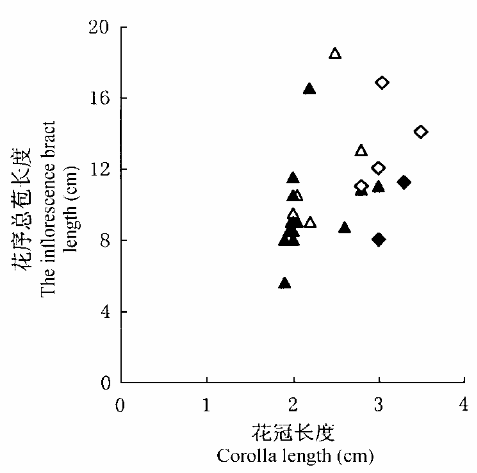

图3 两个物种早期馆藏标本的花冠长度和总苞长度散点图 空心菱形为有颜色记载被鉴定为西藏秦艽的标本，实心菱形为没有新鲜颜色记载的来自西藏东南部鉴定为西藏秦艽的标本；实心三角形为有颜色记载被鉴定为粗茎秦艽的标本，空心三角形为无颜色记载被鉴定为粗茎秦艽的标本。

Fig. 3. The scatter plots of corolla length against the inflorescence bract of identified specimens kept in the herbaria. Blank rhombi, *G. tibetica* with fresh color records; solid rhombi, *G. tibetica* from southeast Tibet without fresh color records; solid triangles, *G. crassicaulis* with fresh color records and black triangles, *G. crassicaulis* without fresh color records.

2.3 DNA序列分析

本实验共获得粗茎秦艽和西藏秦艽复合体10个居群共69个个体的ITS全序列和*trn*S-G序列。能反应种间区别的变异信息位点，物种之间的“P”模式遗传距离如表3和表4所示(未包括那些不能反映种间信息的变异位点)。从表3可以得知，典型的粗茎秦艽和西藏秦艽的ITS序列长度分别为626 bp和629 bp，变异位点有10个，其中ITS1和ITS2区域各占5个位点，两个物种之间的遗传距离为1.0%。未在形态上介于两个种之间的个体和居群中发现ITS差异位点的重叠现象。西藏东南部花冠大以及花冠为淡黄色的形态变异个体或者居群拥有与云南典型的粗茎秦艽完全一样的ITS序列。西藏芒康

表4 粗茎秦艽和西藏秦艽的ITS和*trn*S-G序列排列对齐后的变异位点

Table 4 The divergent sites of ITS and *trn*S-G sequences between *G. crassicaulis* and *G. tibetica*

	ITS									
	29	42	115	117	184	423	557	562	585	605
G. crassicaulis	G	C	C	—	T	C	A	A	T	T
G. tibetica	A	A	T	◆	G	T	G	G	C	C

	*trn*S-G						
	68	229	293	458	486	533	534
G. crassicaulis	—	—	T	—	—	T	A
G. tibetica	▲	T	G	G	★	C	G

◆＝TGA, ▲＝ATAGATATTATATGGATATGTACAC, ★＝GAGGATACT.

的两个居群BD和RM花冠小、蓝色, 形态特征与云南典型的粗茎秦艽类似, 但在ITS序列上却与其余粗茎秦艽以及形态过渡居群有两个位点的自征变异。*trn*S-G序列长度分别为528 bp和567 bp, 其差异主要是有4个共36 bp的缺失(missing)位点, 另有3个核苷酸替代(substitution)(表4), 这些差异主要存在于两个种之间, 该序列在种内未检测到变异位点。西藏东南部的所有居群和个体(形态上为粗茎秦艽的居群以及形态上介于两个种之间的居群和个体)都拥有和典型粗茎秦艽完全一致的*trn*S-G序列。这些结果共同表明西藏东南部的这些居群不是近期由于杂交渗入造成形态变异的。

2.4　粗茎秦艽和西藏秦艽复合体居群的聚类分析

用CLUSTAL X对齐后的ITS序列总长为630 bp, 空位始终当作缺失处理, 共有信息位点9个, 启发式搜索得到仅有的1棵简约树(图4), *CI*=1.0(*CI*=1.0, excluding uninformative characters), *RI*=1.0, 步长=18。 *trn*S-G序列用CLUSTAL X对齐后共长563 bp(排除没有信息位点的polyA和polyT结构), 当空位作缺失处理时, 共有信息位点3个, 启发式搜索得到1棵简约树(图5), *CI*=1.0, *RI*=1.0, 步长=3。基于ITS序列矩阵和基于*trn*S-G序列矩阵得到的两棵最大简约树的拓扑结构一致, 各分成2支, 均有很高的自展分析值(ITS, 97和98; *trn*S-G, 88和98), 这两个分支与居群的地理分布有密切关系。东部的几个居群包括LT、LJ、RM、BD位于粗茎秦艽这一支, 而形态上介于粗茎秦艽和西藏秦艽之间的3个四倍体居群MK、ZG和BM的ITS序列和*trn*S-G序列均与粗茎秦艽一致。另一支由西藏的QS、QX、NG 3个居群组成西藏秦艽。RM和BD两个居群的ITS序列在粗茎秦艽这一支内形成一个亚分支, 主要是由于它们存在2个相同的自变异位点引起的(结果中未列出)。进一步将研究居群倍性以及它们应归属的种类总结见图1。

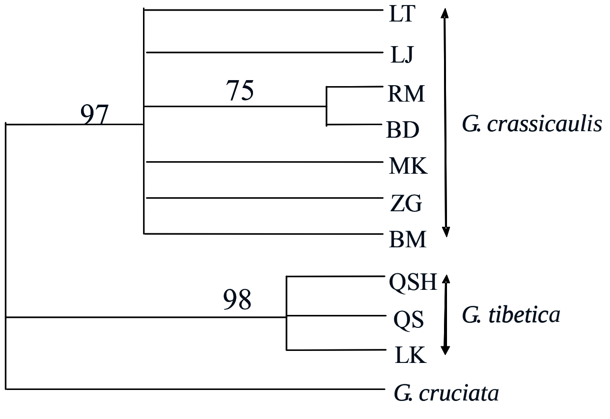

图4　基于ITS序列分析得到的唯一最简约树　分支上的数据为自展分析支持率(bootstrap值, 1000次重复).
Fig. 4.　The single maximum parsimonious (MP) tree based on ITS sequences.　Numbers above internodes are bootstrap values based on 1000 replicates.

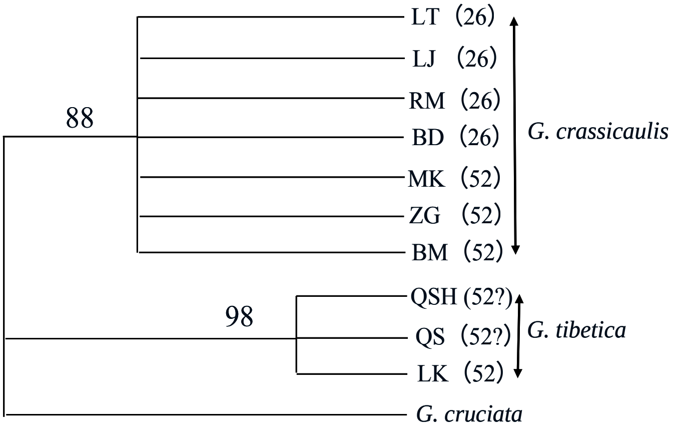

图5 基于*trn*S-G序列的唯一最简约树 分支上的数据为自展分析支持率(bootstrap值，1000次重复)，括号内的数字表示各居群所对应的染色体数目。

Fig. 5. The single MP tree based on *trn*S-G sequences. Numbers above internodes are bootstrap values based on 1000 replicates. The numbers in the brackets are the chromosome numbers of the corresponding populations analyzed.

3 讨论

3.1 粗茎秦艽和西藏秦艽的形态与分子界定

对于形态上位于两个典型物种之间的居群或者个体形成，最大的可能性是由于两个物种的杂交或者渗入杂交造成的(Grant, 1963; Arnold, 1997)。因此，对于西藏东南部形态上的过渡居群或者个体，首先的假设为它们是粗茎秦艽和西藏秦艽的杂交后代。在这种假设下，过渡居群或者邻近的居群中应该有两个物种的基因型存在(Arnold, 1997)。为避免单个个体取样时的误差，我们对大部分的居群都进行了多个个体取样，其中西藏芒康和左贡的4个居群还取样研究了10个个体，个体之间的距离相隔10 m以上，并且也含有花冠颜色不同的个体，但*trn*S-G和ITS标记的结果表明这些居群或者个体毫无例外都应属于粗茎秦艽，没有发现其中的个体与典型的西藏秦艽个体聚为一支(图4)。因为叶绿体DNA在绝大多数被子植物中都是母系遗传(Mogensen, 1996)，如果这种遗传方式在龙胆科仍然如此，则说明这些个体或者居群的母系来源都是粗茎秦艽；而ITS是双亲遗传，如果形态上的过渡个体是杂交或者渗入造成的，则应该在这些个体直接测序中发现由于杂交而来自双亲的位点叠加性(additivity) (Wendel et al., 1995; Koch et al., 2003)。但是，我们的ITS研究结果未发现这些情况，进一步表明这些形态过渡居群或者个体不是杂交产生的。

西藏秦艽目前进行过染色体调查的居群或者个体都是四倍体，而粗茎秦艽在其模式产地(云南)却是二倍体。形态统计分析(图2)发现，粗茎秦艽的二倍体个体与四倍体的西藏秦艽确实存在花冠大小的区别，因而以前将这一特征作为粗茎秦艽和西藏秦艽之间的重要区别点(Ho & Liu, 2001)确有其统计依据。但是，四倍体植株总苞长度变短，统计分析发现均落在二倍体长度范围之内(图2，3)；染色体加倍可能导致花序总苞长度变短，但

花序总苞片大小与地区、倍性以及两个物种之间的分子谱系分支都没有相关性，因此这一性状不能用作两个物种的鉴别依据，没有分类学意义。西藏东南部居群在染色体倍性上为二倍体、四倍体或者两个倍性共同存在于同一居群中。二倍体的居群或者个体与典型的粗茎秦艽具有相同的形态特征：花冠小和檐部为蓝色或蓝紫色。但是，四倍体的花冠变大，与西藏秦艽相似；更为重要的是部分四倍体个体的花颜色变淡，因而这两个特征使这些个体在外部形态看起来完全具有西藏秦艽的分类鉴别特征。尽管我们不知道花颜色变化的分子或者生理机制，但根据西藏秦艽染色体的倍性和花颜色状况，很显然这一变化可能与分布居群的海拔高及多倍化有一定联系。因此，西藏东南部粗茎秦艽的部分个体类似于西藏秦艽的主要原因是由于多倍化导致的花冠长度增加以及可能由于多倍化或者高海拔分布导致的花颜色变化引起的。采自该地区无新鲜颜色记载的部分标本以及新鲜花颜色为淡黄色的个体过去被鉴定为西藏秦艽(图3)，其实应该为粗茎秦艽的四倍体。利用分子手段来进行植物种间的分类确实具有一定的优势(Tautz et al., 2003)，并且能鉴定分化时间较久、但形态上没有变异的隐性种(cryptic species) (Dick et al., 2003; Dawson et al., 2005)。但我们的研究结果表明，只有在广义形态学(如染色体数目等)的综合研究基础上才能对有关形态分类鉴别特征的种内变异原因和机制有更为深刻的认识。

青藏高原自第三纪以来的快速隆升导致了该地区分布的生物类群的快速辐射分化(Yang et al., 2003; Luo et al., 2005; Wang et al., 2005; Liu et al., 2006)。龙胆属中的部分类群也存在这种趋势(Yuan & Küpfer, 1997)；我们对秦艽组的研究也发现该类群存在快速辐射分化，大概发生在4.5–1.7百万年前，可能与青藏高原在这一时期大规模的隆起和气候剧烈变化有关(Zhang et al., 2006, unpublished data)。随着高原隆起导致的生境隔离与片段化，物种之间的形态分化可能是在相对较短的时间内完成，而遗传分化却相对很小。例如在粗茎秦艽和西藏秦艽之间，ITS序列和cpDNA *trn*S-G序列分别只检测到1%和0.6%的差异，因此它们之间的生殖隔离可能尚未完全建立起来，在它们相遇的地方可能存在杂交和渗入。本研究表明这两个物种的地理分布界限不是位于云南、四川和西藏三省交界的芒康地带，因而在这一地区不存在杂交或者渗入的前提条件，它们之间的杂交可能位于西藏波密更向西的一些地区。由于该研究中我们没有分析曲松至波密之间的居群，所以不能非常清楚地界定粗茎秦艽和西藏秦艽在西藏的分布边界，还有待研究更多的中间居群来解决这个问题。但是，从目前的染色体倍性分布来看，如果两个物种在上述地区存在杂交或者渗入，应该是在四倍体水平上发生的。我们正在进行的研究确实发现在林芝地区两个物种存在较为频繁的在四倍体水平上的杂交和渗入，并且在形态上不能区分两个物种(未发表数据)(植株花冠大、花颜色为淡黄色，部分植株的冠檐为淡紫红色)，这一地区的标本在过去的分类研究中都是作为西藏秦艽来处理的(Ho & Liu, 2001)。

3.2　粗茎秦艽种内多倍化及两种细胞型的分布与扩散

多倍化被认为是植物物种多样化的重要驱动力之一(Levin, 2002)，尤其是能导致快速的物种形成(Hiremath & Salimath, 1991; Leitch & Bennett, 1997)。但青藏高原地区特有物种的多倍化不是十分普遍，Nie等(2005)等对横断山脉44科152属共552种被子植物的染色体数目进行了统计，发现如果把多倍化建立在同属的物种核基因组含有3套或3套以上的基本染色体(≥3*x*)基础上计算，只有22%(124/552)被统计的物种中发现有多倍体。因

此，该地区的快速物种多样化主要是在二倍体水平上发生的，可能与高原隆升与气候变迁导致的异域快速物种分化有关(Liu, 2004; Nie et al., 2005)。龙胆属秦艽组共21个物种，中国西南部的横断山脉地区(包括西藏东部、云南西北部和四川西部)是它最重要的物种多样性分布中心(Ho & Liu, 2001)。在已有染色体研究的14个物种中，报道有二倍体($2n$=26)居群的物种为11个;发现有四倍体($2n$=52)的物种仅为3个(何廷农等，1997; Ho & Liu, 2001)，这些物种研究的居群较少，是否还存在二倍体居群仍有待研究；目前已研究的青藏高原地区分布的物种中仅西藏秦艽所有居群都是四倍体，而其他已研究的物种或为二倍体或具有二倍体和四倍体两种细胞型。因此，秦艽组在青藏高原的物种分化可能也主要是在二倍体水平上进行的。

种内染色体数目变化以及多倍化是一种比较常见的现象(Leitch & Bennett, 1997)，如澳大利亚东南部特有种*Rutidosis leptorrhynchoides* F. Muell. 19个居群中发现有17种细胞型，但主要是以二倍体(x=11)和四倍体为主(Murray & Young, 2001)。除本文发现的粗茎秦艽存在种内多倍化外，秦艽组内的麻花艽*G. straminea* Maxim.也有二倍体和四倍体两种细胞型。虽然本次研究所取的染色体材料较少，对四川和西藏的部分地区(如察隅)等地的居群没有进行染色体研究，但根据花冠大小可以判断在粗茎秦艽的分布范围内，二倍体居群和四倍体居群占有不同的但连续的地理区域：二倍体主要分布在靠西藏芒康东部的四川、云南及芒康一带；四倍体则分布在西藏芒康及芒康以西的左贡、波密、察隅等地区(图2)。

物种内原始的细胞类型分布区域是该物种最初与近缘种分化并起源的地点(Grant, 1963)。根据染色体倍性变化是不可逆的进化原则(Stebbins, 1971)，粗茎秦艽二倍体的分布式样表明该物种最初的起源可能是云南西北部或四川西南部。种内多倍化居群或者个体往往发生在物种分布范围内环境较恶劣的新占据地域，染色体的加倍有利于这些个体在长时间内忍受新生境带来的生存压力(Levin, 2002)。因此，粗茎秦艽在进入西藏高原后为了更好地适应新生态环境而选择留下了染色体加倍的个体；这些四倍体显然是来源于其祖先的二倍体分布区域。该物种二倍体和四倍体的分布式样反映出西藏的部分高山植物起源于云南西北部或者四川西南部等青藏高原的东南缘，然后再扩散到高原的核心地带西藏地区。这种起源和扩散方式是否存在于其他西藏分布的高山植物中，仍有待于进一步研究。

参考文献

Arnold M L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford: Oxford University Press.

Chen S-Y (陈生云), Chen S-L (陈世龙), Xia T (夏涛), Wang Y-J (王玉金). 2005. Phylogeny of *Metagentiana* and related genera (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal ITS sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 43: 491–502.

Dawson M N, Gupta A S, England M H. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102: 11968–11973.

Dick C W, Abdul-Salim K, Bermingham E. 2003. Molecular systematic analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. The American Naturalist 162: 691–703.

Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. Phytochemical Bulletin 19: 11–15.

Grant V. 1963. The origin of adaptations. New York: Columbia University Press.

Hamilton M B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. Molecular Ecology 8: 521–523.

Hiremath S C, Salimath S S. 1991. Quantitative nuclear DNA changes in *Eleusine* (Gramineae). Plant Systematics and Evolution 178: 225–233.

Ho T-N (何廷农). 1985. A study on the genus *Gentiana* of China (1). Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 23: 43–52.

Ho T-N (何廷农). 1988. In: Wu Z-Y, Raven P H eds. Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press. 62: 67–70.

Ho T-N, Liu S-W. 2001. A worldwide monograph of Gentiana. Beijing: Science Press. 480–481.

Ho T-N (何廷农), Liu J-Q (刘建全), Zhang D-C (张定成). 1997. The karyotypes and chromosome numbers in nine species of *Gentiana* from alpine mountains of western China. Acta Biologica Plateau Sinica (高原生物学集刊). 13: 9–19, pl. I–II. Beijing: Science Press.

Ho T-N (何廷农), Liu S-W (刘尚武), Lu X-F (卢学峰). 1996. A phylogenetic analysis of *Gentiana* (Gentianaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 34: 505–530.

Hsia K-C (夏光成), Hsiao P-K (肖培根), Ma Y-C (马毓泉). 1965. A botanical study of the Chinese drug chinchiao. Acta Pharmaceutica Sinica (药学学报) 3: 309–411.

Koch M A, Dobes C, Mitchell–Olds T. 2003. Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). Molecular Biology and Evolution 20: 338–350.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinformation 5: 150–163.

Leitch L J, Bennett M D. 1997. Polyploidy in angiosperms. Trends in Plant Science 2: 470–475.

Levin D A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press.

Liu J Q. 2004. Uniformity of karyotypes in *Ligularia* (Asteraceae: Senecioneae), a highly diversified genus of the eastern Qinghai-Tibet Plateau highlands and adjacent areas. Botanical Journal of the Linnean Society 144: 329–342.

Liu J Q, Wang Y J, Wang A L, Ohba H, Abbott R J. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia–Cremanthodium–Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. Molecular Phylogenetics and Evolution 38: 31– 49.

Luo Y, Zhang F M, Yang Q E. 2005. Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequences. Plant Systematics and Evolution 252: 11–25.

Ma Y-C (马毓全), Hsia K-C (夏光成), Hsiao P-K (肖培根). 1964. Study on the genus *Gentiana* L. section *Aptera* Kusnez. in China. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol (内蒙古大学学报自然科学版) 1: 33–51.

Mogensen H L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. American Journal of Botany 83: 383–404.

Murray B G, Young A G. 2001. Widespread chromosome variation in the endangered grassland forb *Rutidosis leptorrhynchoides* F. Muell. (Asteraceae: Gnaphalieae). Annals of Botany 87: 83–90.

Nie Z L, Wen J, Gu Z J , Boufford D E, Sun H. 2005. Polyploidy in the flora of the Hengduan Mountains hotspot, southwestern China. Annals of the Missouri Botanical Garden 92: 275–306.

Rieseberg L H. 1997. Hybrid origins of plant species. Annual Review of Ecology and Systematics 28: 359–389.

Sakai M, Kanazawa A, Fujii A, Thseng F S, Abe J, Shimamoto Y. 2003. Phylogenetic relationships of the chloroplast genomes in the genus *Glycine* inferred from four intergenic spacer sequences. Plant Systematics and Evolution 239: 29–54.

Stebbins G L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London: Addison-Weslery.

Swofford D L. 2000. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas R H, Vogler A P. 2003. A plea for DNA taxonomy. Trends in Ecology and Evolution 18: 70–74.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nuclear Acids Research 25: 4876–4882.

Wang A L, Yang M H, Liu J Q. 2005. Molecular Phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the Rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trn*L-F sequences. Annals of Botany 96: 489–498.

Wang Y-J (王玉金), Li X-J (李小鹃), Hao G (郝刚), Liu J-Q (刘建全). 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 42: 481–499.

Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 280–284.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press. 315–322.

Yang F S, Wang X Q, Hong D Y. 2003. Unexpected high divergence in nrDNA ITS and extensive parallelism in floral morphology of *Pedicularis* (Orobanchaceae). Plant Systematics and Evolution 240: 91–105.

Yuan Y M. 1993. Karyological studies on *Gentiana* section *Cruciata* Gaudin (Gentianaceae) from China. Caryologia 46: 99–114.

Yuan Y M, Küpfer P. 1997. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* Bunge s.l. (Gentianaceae): evidence from the nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Botanical Journal of the Linnean Society 123: 25–43.

Yuan Y M, Küpfer P, Doyle J J. 1996. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. American Journal of Botany 83: 641–652.

Yuan Y M, Küpfer P, Zeltner L. 1998. Chromosomal evolution of *Gentiana* and *Jaeschkea* (Gentianaceae), with further documentation of chromosome data for 35 species from western China. Plant Systematics and Evolution 210: 231–247.

Zhang Q (张茜), Yang R (杨瑞), Wang Q (王钦), Liu J-Q (刘建全). 2005. Phylogeography of *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from the chloroplast DNA *trn*T–*trn*F sequence variation. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 43: 503–512.